

PCT/JPC0/01353

06.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

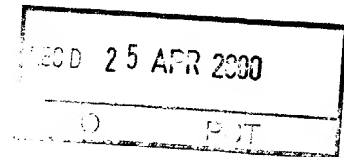
JPO0/01353

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年10月20日



出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第298613号

出 願 人
Applicant(s):

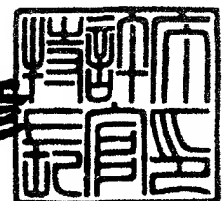
三菱レイヨン株式会社

EKV

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3023377

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸固定化高分子ゲル及びその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 修飾された核酸がグリシジル基を介して結合、固定化された核酸固定化高分子ゲル。

【請求項 2】 修飾された核酸が末端をアミノ化した核酸である請求項 1 記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項 3】 高分子ゲルがグリシジル（メタ）アクリレート、重合性モノマー及び架橋剤との共重合体ゲルである請求項 1 または 2 記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項 4】 重合性モノマーがアクリルアミドである請求項 3 記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項 5】 グリシジル（メタ）アクリレートと修飾された核酸を反応させた後に、重合性モノマー及び架橋剤を加えて重合させることを特徴とする請求項 1～3 いずれか 1 項に記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【請求項 6】 グリシジル（メタ）アクリレート、重合性モノマー及び架橋剤との共重合体ゲルに、修飾された核酸を作用させることを特徴とする請求項 1～3 いずれか 1 項に記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【請求項 7】 修飾された核酸が末端をアミノ化した核酸である請求項 5 または 6 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【請求項 8】 重合性モノマーがアクリルアミドである請求項 5 または 6 記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸固定化高分子ゲル及びその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子を

はじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができる。その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限があるが、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一遺伝子レベルという極めて多数の遺伝子の総合的・系統的解析を行うために、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発されてきた。

【0003】

本発明者らの一部は、先にマイクロアレイの新規な製造法を開発し、出願している（特願平11-84100号明細書参照）。該発明は、核酸固定化ゲルをその中に保持する核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を作製し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより薄片を得るものである。この薄片は固定化核酸二次元高密度配列体、すなわちマイクロアレイである。

【0004】

ゲルに核酸を固定化する試みはなされており、例えば、ヒドロキシスクシンイミドを脱離基としてもつ共重合体ゲルにアミノ化DNAを固定化する方法（*Polym. Gel. Netw.*, 4, (2), 111 (1996)）、アルデヒド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法（*Nucleic Acid Res.*, 24, 3142 (1996)）、メシル基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法（*ibid.*）、ヒドラジド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアルデヒド化したDNAを結合させる方法（*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 4913 (1996)）等が知られている。しかしながら、操作性と実用性の問題から、より優れた方法が求められていた。

【0005】

アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法 (Nucleic Acids Res., 11 (18), 6513- (1983)) に従い調製することができる。

【0017】

修飾された核酸の高分子ゲルへの固定化は、高分子ゲルと修飾された核酸を混合することによって行うことができる。反応率あるいは反応速度を考慮し、塩基などの触媒を用いることも可能である。

【0018】

固定化温度は、0℃から100℃が好ましく、さらには、20℃から80℃が好ましい。

【0019】

核酸固定化高分子ゲルは、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する核酸の検出に用いることができる。

【0020】

本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化高分子ゲルを検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。また、広義には、検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる核酸を指す。

【0021】

したがって、固定化高分子ゲルは、固定化された核酸（プローブ）とハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に限定されず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料、例えば生体成分等を検出するために利用することも可能である。

【0022】

固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異

的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸、タンパク質又は低分子化合物等に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0023】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0024】

実施例 1

(1) 5' 末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの作製

以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）を合成した。

プローブA：GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGG
GCTC（配列番号1）

プローブB：GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAG
CAG（配列番号2）

【0025】

オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機DNA/RNA synthesizer（model 394）（PEバイオシステムズ社製）を用いて行い、DNA合成の最終ステップで、アミノリンクII（アプライドバイオシステム社製）を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5' 末端に $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

【0026】

(2) 核酸固定化高分子ゲルの作製

(1) で得られたプローブA又はB（ 500nmol/ml ） $5\mu\text{l}$ 及びグリシジルメタクリレート $5\mu\text{l}$ を混合し、 70°C で2時間反応させた。そこへモノマー混合水溶液（アクリルアミド47.5%w/w及びメチレンビスアクリルア

ミド2.5%w/wを含む水溶液) 50 μ l、水450 μ l及び10%アゾビスイソブチロニトリル水溶液 5 μ lを加え、70℃で2時間重合反応を行い、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは5mmの厚さに切り出し、検出操作を行った。

【0027】

(3) 試料核酸の標識

試料核酸のモデルとして、(1)で作製したプローブA及びBの配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドC及びDを合成した。

オリゴヌクレオチド C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号3)

オリゴヌクレオチド D: CTGCTGTCCCAAACCTGACCTCCACC (配列番号4)

【0028】

これらのオリゴヌクレオチドの5'末端に、(1)と同様にしてアミノリンクII (PEバイオシステムズジャパン社製)を用いて、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6$ を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン (DIG: Digoxigenin, ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で標識した。

【0029】

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドを、それぞれ終濃度2mMとなるように100mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解した。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/ml ジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

【0030】

容量を100 μ lに調整し、2 μ lのグリコーゲン (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、300 μ lの冷エタノールを加え、15,000rpm、15分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。さらに、沈殿に500 μ lの70%エタノールを加え、15,000rpm、5分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿を風乾し、100 μ l

の10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTAに溶解した。
 こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0031】

(4) ハイブリダイゼーション

(2) で作製した核酸固定化高分子ゲル切片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、下記の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間、プレハイブリダイゼーションを行い、(3) で得られたDIG標識DNAを加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション溶液組成；

5XSSC

5% ブロッキング試薬 (DIG Detectionキット中の試薬)

0.01% N-ラウロイルザルコシナトリウム

0.02% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

【0032】

(5) 検出

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化高分子ゲル切片を、あらかじめ保温しておいた50mlの0.1XSSC、0.1%SDS溶液に移し、振盪しながら45℃、20分間、洗浄を3回行った。

【0033】

次に、DIG緩衝液1 (0.1M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム (pH7.5)) を加え、室温で振盪しながらSDSの除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG緩衝液2 (DIG緩衝液に0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの) を加え1時間振盪した。緩衝液を除いた後、 10^{-4} 量の抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体 (DIG Detectionキットの試薬) を含むDIG緩衝液2 10mlを加え、30分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に0.2%Tween20を含むDIG緩衝液1で15分間、2回振盪することにより洗浄し、引き続きDIG緩衝液

3 (0.1M トリス-塩酸 (pH 9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム) に3分間浸した。DIG緩衝液3を除いた後、CDP-Star (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) を含むDIG緩衝液3mlを加えた。

【0034】

水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

【0035】

その結果、プローブAのゲル切片には、オリゴヌクレオチドCが結合し、またプローブBのゲル切片には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

【0036】

実施例2

(1) グリシジル基含有高分子ゲルの作製

アクリルアミド 4.65重量部、メチレンビスアクリルアミド 0.25重量部、グリシジルメタクリレート 0.1重量部からなる水溶液にアゾビスイソブチロニトリルを0.1%濃度になるように加え、70℃で2時間反応させ、高分子ゲルを作成した。

【0037】

(2) 核酸固定化高分子ゲルの作製

(1) で作製した高分子ゲルを10mm角の厚さに切り出し、実施例1の(1)の方法で作製したプローブA又はB (500nmol/ml) 100μlを混合し、70℃で2時間反応させ、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは5mmの厚さに切り出し、実施例1の(3)、(4)、(5)と同様の操作で検出を行った。

【0038】

その結果、プローブAのゲル切片にはオリゴヌクレオチドCが結合し、またプローブBのゲル切片には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

本発明によれば、修飾された核酸が効率的にかつ強固に固定化した核酸固定化ゲルを得ることができる。また、この材料を用いて検体中の核酸を検出する際、洗浄操作中などに生じる核酸の脱離に伴う感度の低下などの問題点を克服することができる。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> Nucleic acid-fixed polymer and that production method

<130> P110496000

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

27

【0041】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

特平 11-298613

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸固定化高分子ゲル及びその製造法の提供。

【解決手段】 高分子表面及びその内部にグリシジル基を介して、核酸を効率良く且つ強固に高分子ゲルに固定化できる。

【選択図】 なし

特平11-298613

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 {000006035}

1. 変更年月日 1998年 4月23日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区港南一丁目6番41号
氏 名 三菱レイヨン株式会社